



# 部位特異的非天然アミノ酸導入法を応用したタンパク質翻訳制御法の研究

著者	皆葉 正臣
発行年	2015
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7365号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00126076">http://hdl.handle.net/2241/00126076</a>

氏名（本籍）	皆葉 正臣		
学位の種類	博 士 （農学）		
学位記番号	博 甲 第	7365	号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	部位特異的非天然アミノ酸導入法を応用したタンパク質翻訳制御法の研究		
主査	筑波大学教授	工学博士	王 碧昭
副査	筑波大学教授	農学博士	河瀬 真琴
副査	筑波大学教授	理学博士	中村 幸治
副査	筑波大学教授	博士(学術)	中島 敏明
副査	農業生物資源研究所 上級研究員	博士(薬学)	加藤 祐輔

## 論 文 の 要 旨

従来の遺伝子工学の発展形として、遺伝子ネットワーク全体を人工的に構築する合成生物学に期待が寄せられている。その技術的基盤は、転写・翻訳から翻訳後レベルまで精密かつ複合的な制御を行う遺伝的パーツである。これらのパーツを組み合わせ、合成生物学以前単純な遺伝子発現の操作では叶わなかった複雑で精緻な生物機能を人工的に付与できるようになった。このような複雑な遺伝子ネットワークの構築には、信頼できる遺伝的パーツが多数必要であり、より多くの新しい遺伝的パーツの開発が求められている。

本研究の目的は、部位特異的非天然アミノ酸導入法を応用した遺伝子の発現を翻訳レベルで調節する新しい遺伝的パーツである「翻訳スイッチ」の作出である。この方法の新規性は、スイッチを構成する複数の要素を複合的に制御することにより、厳密性や最大出力など、スイッチング性能の容易な調節が期待できる点にある。本研究は、主に三つパーツを構築した：（１）部位特異的非天然アミノ酸導入系を応用した翻訳のオン・オフを出力とする AND ゲートおよび翻訳スイッチの構築、（２）翻訳スイッチにおける漏洩翻訳の抑制手段の検討、（３）翻訳スイッチを応用した高収量無漏洩発現系の開発である。翻訳スイッチは、一つの物質入力（非天然アミノ酸であるヨウ化チロシン、IY）と二つのプロモーター入力（アミナアシル tRNA 合成酵素である IYRS、および tRNA である MJRI に対する発現調節）の三つの入力を統合する AND ゲートを出発点にしている。AND ゲートは、コンピューターを構成する理論回路の一つであり、入力の全てが ON 状態の場合、出力が ON になる理論回路である。この AND ゲートから三つの翻訳スイッチ(IY, IYRS, MJRI)を発生的に作成した。これらの翻訳スイッチの動作は実験的に検証した。一方、これらの翻訳スイッチは OFF 応対においても検出可能な漏洩翻訳が観測されたため、抑制手段を構築・検討した。その結果、3 種の翻訳スイッチ間の併用および標的遺伝子に挿入するアンバー終止コドンの多重化による漏洩発現が抑制された。さらに上記作生した翻訳スイッチをパーツとして、高収量かつ無漏洩の発現システムの開発を行った。既存の転写レベルでのみ調整する発現系では、高収量

であれば誘導抑制時の漏洩発現が大きく、漏洩発現を抑制しようとするれば低収量に甘んずる必要があり、高収量と無漏洩は、トレード・オフの関係とされている。この矛盾を解決する手段として、本研究において開発した翻訳スイッチを、既存の厳格な転写調整計と組み合わせ、発現を転写・翻訳二重制御にすることを着想し、高収量と無漏洩を両立する発現系の遺伝回路を設計し、その機能を実験的に検証した。上記三つの構築系を検証した結果、部位特異的非天然アミノ酸導入性を応用した翻訳スイッチは、大腸菌の遺伝子発現を翻訳レベルでスイッチングする新しい良質な遺伝的パーツであると結論した。その有望な応用法として、転写一翻訳二重制御による高収量無漏洩発現系の構築に成功した。

## 審 査 の 要 旨

本研究では、部位特異的非天然アミノ酸導入を応用して、大腸菌における新たな翻訳スイッチを開発した。この翻訳スイッチは、遺伝子発現を翻訳レベルで調節できる遺伝的パーツであり、単純かつ高信頼性であり、実用性も高い。本研究で作成した翻訳スイッチは、宿主の増殖性に影響がない、しかも異常な表現型が認められないことから、独立性をよく満たしていると考えられる。この翻訳スイッチは、環境や体内に存在していない非天然アミノ酸により動作するので、環境ノイズに起因する誤作動はなく、信頼性は高い。また、異なる種類の翻訳スイッチとの併用、アンバー終止コドンの重ね数、aaRS や tRNA の発現レベルやバランスの調整により、スイッチの厳密性や最大翻訳効率を幅広く調整可能であり、調整性がすぐれている。以上により、本研究において開発した翻訳スイッチは、遺伝的パーツに必要な条件から評価して、優秀であると考ええる。また、この翻訳スイッチを応用して構築した高収量無漏洩発現システムは、強毒性タンパク質の発現系、毒性のあるクローンを含む可能性のある発現ライブラリーの構築、及び代謝工学における酵素発現の調節等への適用が期待できる。部位特異的非天然アミノ酸導入系は、酵母、線虫、昆虫、哺乳類培養細胞、および植物にも適用例が報告されている。従って、この翻訳スイッチも、大腸菌に限らず、他の生物種に適用を拡大できることが期待される。

平成27年1月23日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、さらに英語能力も評価し、その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。